# 环六亚甲基双乙酰胺体外诱导胚胎性癌B7—2细胞分化对$MS_3$基因表达的影响

何全品　林斯骏　许以盛*　姚　鑫
（中国科学院上海细胞生物学研究所）

**摘　　要**

$MS_3$ cDNA是多潜能胚胎性癌细胞专一的顺序，HMBA可诱导B 7—2细胞分化为原始内胚层样细胞。用定量细胞质RNA点印迹杂交法分析了$MS_3$基因在小鼠胚胎性癌B 7—2细胞经HMBA诱导前和诱导后的表达水平。小鼠成纤维细胞NIH3T3被用作阴性对照。$MS_3$基因的表达水平在B 7—2细胞经HMBA诱导5天后下降了86%。鉴于HMBA对B 7—2细胞的诱导效率约为90%，这一实验结果表明在HMBA诱导分化中，$MS_3$基因的表达被抑制。

**关键词**　胚胎性癌细胞（EC）　环六亚甲基双乙酰胺　诱导分化
多潜能胚胎性癌细胞　专一的顺序　点印迹杂交

$MS_3$基因编码一种长6 kb的RNA（$MS_3$ RNA）。$MS_3$ RNA在体外模型系统中仅见于各种胚胎性癌细胞（许以盛等，1984）。在体内系统中仅见于内细胞团等多潜能早期胚胎细胞（Brulet, P., 1984)。在分化细胞的细胞质中不能检查出$MS_3$ RNA (Xu, Y. S. *et al*., 1983)。

B 7—2细胞系我们实验室自129/sv-ter品系小鼠的一个自发性睾丸畸胎瘤中分离得到的克隆化细胞。B 7—2细胞属于胚胎性癌细胞，经5 m*M* HMBA诱导5天后，其中约90%成为分化细胞，这种分化细胞相当于早期胚胎的原始内胚层细胞（丛笑倩等，1984）。

本文报道经HMBA诱导分化后，B 7—2细胞中的$MS_3$基因的表达水平极大地下降了。这一实验结果为$MS_3$基因表达的早期多潜能胚胎细胞特异性提供了直接证据，建立起一个有助于阐明$MS_3$基因细胞特异性表达的调控机理的体外模型，以便在基因表达水平上研究早期胚胎细胞的分化过程。

---

* 中国科学院昆明动物研究所

本文1985年6月13日收到，1986年4月15收到修改稿。包林平同志提供培养细胞。

# 材 料 与 方 法

**细胞** 所用的B7—2细胞及3T3细胞的培养方法已作过报道(丛笑倩等，1984)。

**B7—2细胞的HMBA诱导分化** B7—2细胞用5m*M* HMBA诱导分化，具体方法见以前报道（丛笑倩等，1984）。

**微量RNA制备** 主要参照Meinkoth等人所综述的有关方法进行(Meinkoth, *et al.*, 1984)。所用的细胞数量一般为$5\times10^{7}$。细胞先用冰冷的磷酸缓冲液淋洗两次，然后悬于3ml 10m*M* VRC (Vanadyl-ribonucleotide Complexes)，10m*M* Tris·HCl (pH 7.0)，和1m*M* EDTA溶液中，接着添加150μl 10% NP-40溶液，混匀后在冰浴放置5分钟，再添加150μl 10% NP-40溶液，混匀后在冰浴继续放置5分钟。在12000RPM离心2.5分钟后，上清液即为细胞质组分，立即用酚等试剂抽提细胞质组分两次。水箱中加入75μl 0.5*M* EDTA使VRC分解，然后用乙醇沉淀法回收RNA。

**细胞质RNA的点印迹杂交** 也主要参照上述文献（Meinkoth, *et al.*, 1984）进行。将20μg RNA样品悬于10μl 1*M*乙二醛，10m*M*磷酸缓冲液（pH7.0）中，在50°C水浴中变性1小时，然后用上述乙二醛-磷酸缓冲液作倍比稀释，再点加在经20×ssc（1个ssc溶液为0.15*M* NaCl—0.015*M* $Na_3C_6H_5O_7$）浸泡并干燥处理过的硝酸纤维素膜上。把点有样品的硝酸纤维素膜在80°C烘烤2小时后，封在塑料薄膜中在42°C预杂交13小时。预杂交液为50%甲酰胺，6×ssc，50m*M*磷酸缓冲液(pH7.0)，5m*M* EDTA，0.1% SDS，5×Denhardt's溶液，100μg/ml酵母tRNA。然后加入热变性后的杂交探针$MS_3$ cDNA（~100,000/ml)，在42°C杂交24小时。$^{32}$p-p$MS_3$ cDNA系用缺口移位法标记，比活为$5\times10^{7}$ cpm/μg，杂交后，硝酸纤维素膜用2×ssc，0.1% SDS溶液和0.1×ssc，0.1% SDS溶液分别洗涤两次，每次20分钟，然后干燥，作放射自显影。

**点印迹杂交信号的测量** 将放射自显影底片作光密度扫描，再将扫描所得的曲线由我所电子计算机应用组张耀远同志进行计算。

# 结 果

**（一）细胞质RNA的定量** 对$MS_3$基因表达水平进行定量分析需要所制细胞质RNA在制备过程中不被分解，另外对RNA要有较精确的定量方法。由于VRC能抑制RNase，我们在提取缓冲液中加入了VRC，所得的细胞质RNA的1%琼脂糖凝胶电泳图谱如图1。从图1可见，我们制备的RNA质量较好，未见明显降解。但由于VRC及酚等试剂的干扰，对这些RNA制剂作紫外分光光度法测定时不能得到定量数据，反映在260mμ/280mμ吸收比值不稳定(表1)。为此，我们对电泳分离的RNA进行了分光光密度扫描(图2)，然后对扫描所得的各RNA峰进行积分计算，确定出RNA的实际含量。此法可以排除倘若存在的已分解的RNA，微量的DNA，以及VRC等试剂的干扰。

**（二）$MS_3$基因在诱导前后的表达水平** 已知$MS_3$基因在分化细胞中并不表达，因此我们用NIH 3T3细胞作为阴性对照，小鼠3T3细胞及B7—2细胞在诱导前和诱导

5天后的细胞质RNA的点印迹杂交结果如图3，可以清楚地看到，$MS_3$ RNA的杂交信号在B 7－2细胞被诱导分化后大大下降了，与作为阴性对照的3T3细胞质RNA的信号相近似。为了得到定量数据，我们对各杂交点作了分光光密度扫描（图4），并进行了积分计算(表2)。在细胞质RNA的加样量为10μg时，扣除作为本底的3T3细胞质RNA的杂交信号后，则诱导后的杂交信号比诱导前降低了86%。鉴于HMBA对B 7－2细胞的诱导分化效率约为90%，这一实验结果表明，诱导后所剩的杂交信号很可能来自10%左右未被诱导成分化细胞的B 7－2细胞，因此，推测在90%的诱导分化细胞中，$MS_3$基因处于不表达状态。在细胞质RNA的加样量为5μg和2.5μg时，虽然由于加样量太小使3T3细胞质RNA的非特异性杂交信号相对显得较大而很难作出精确的比较，但我们仍能看到同样的趋势。

**表1　RNA 的 光 密 度 测 定**

Table 1. Estimation of RNA Concentrations by UV spectroscopy

| RNA \ 波长(mμ) | 260 | 280 | 260/280 |
|---|---|---|---|
| NIH 3T3对照 | 0.403 | 0.316 | 1.3 |
| B 7－2未处理对照 | 0.450 | 0.224 | 2.0 |
| B 7－2 HMBA 5天 | 0.225 | 0.120 | 1.9 |

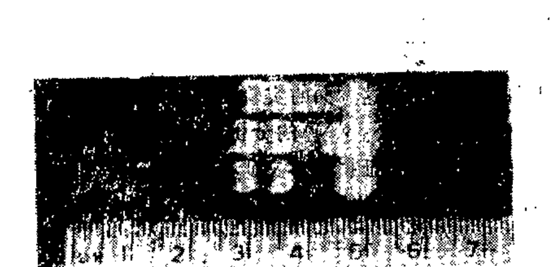


Fig. 1. 1% neutral agarose electrophoresis of cytoplasmic RNAs from 3T3 fibroblast cells (a), B 7－2 cells (b) and differentiated derivatives of B 7－2 cells after 5 days' induction with HMBA (c)

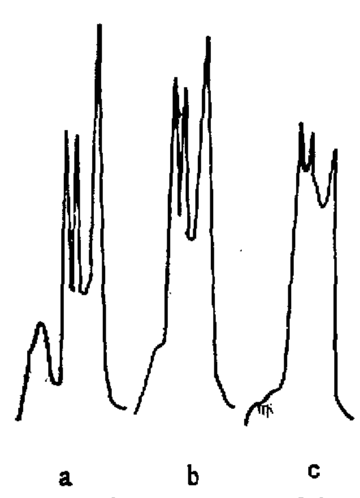



Fig. 2. *Quantitative scanning of the* electrophogram displayed in fig. 1

表2 RNA的杂交信号强度

Table 2. Quantitation of $MS_3$ gene expression

| RNA \ 加样量(μg) | 10 | 5 | 2.5 | 1.25 |
|---|---|---|---|---|
| NIH 3T3对照 | 9.04 | 3.30 | 2.30 | 0 |
| B 7—2未处理对照 | 47.98 | 18.48 | 3.85 | 0 |
| B 7—2 HMBA 5天 | 14.00 | 3.76 | 0 | 0 |

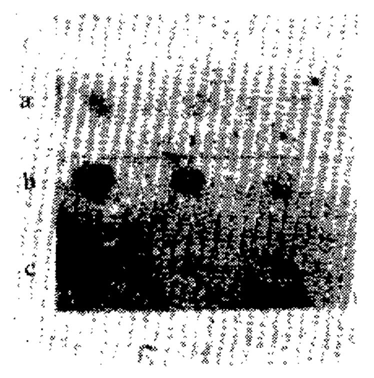



Fig. 3. Dot blot hybridization analysis of cytoplasmic RNAs from 3T3 fibroblast cells (a), B7—2 cells (b) and HMBA induced differentiated derivatives of B7—2 cells (c). $pMS_3$ cDNA was labelled with $^{32}P$ by nick translation procedure and used as probe

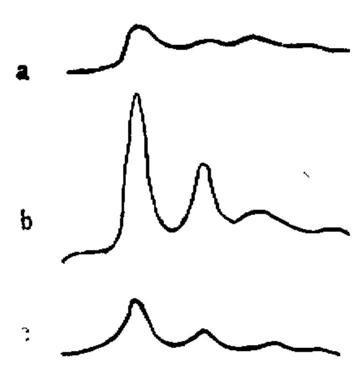



Fig. 4. Quantitative scanning of the dot hybridization signals displayed in fig. 3

## 讨 论

$MS_3$基因表达具有早期多潜能胚胎细胞特异性。这方面的实验证据来自体外建立的各种不同分化潜能的细胞株及早期小鼠胚胎组织中$MS_3$ RNA的分析，但缺少$MS_3$基因在特定细胞的分化过程中其表达发生动态变化的直接证据。本文研究了$MS_3$基因在一株胚胎性癌细胞B 7—2经HMBA诱导前后其表达发生的变化，得到了在B 7—2细胞体外诱导分化过程中$MS_3$基因的表达发生明显变化的直接证据。我们用F9细胞作模型研究了维生素A酸诱导对$MS_3$基因表达的影响，也得到了同样的结果（未发表资料）。但维生素A酸对F9细胞的诱导率较低(70%左右)，因此$MS_3$ RNA在细胞质中的含量在F9细胞经维生素A酸诱导后的下降幅度不如B 7—2细胞经HMBA诱导后的那样大。因此用体外诱导分化方法研究$MS_3$基因表达在细胞分化过程中的动态变化，采用B 7—2细胞显然较F9细胞更为适宜。

我们以前的实验结果提示MS基因主要在转录后水平上被调控的（Xu, Y. S. *et al*, 1984）。我们推测在细胞分化过程中出现了一种对 $MS_3$ RNA 的加工及由核向质转移的特异性负调控机制。显然一个合适的体外诱导分化模型有助于发现并了解这种推测的负调控物质的发生和发展，本文的实验结果为建立这种模型提供了依据。

在B 7—2细胞的体外诱导分化过程中从多潜能EC细胞变为限能细胞，表型标志和恶性生长行为都发生了改变。最近对$p^{53}$蛋白和花生凝集素（PNA）受体及花扁豆凝集素（DBA）受体在诱导过程中的动态变化进行了分析，发现这些标志蛋白的转变在药物诱导的第一至第二天已经完成。诱导第二天以后这些标志的改变已稳定不变（姚鑫等，1986）。对于$MS_3$基因的表达是否在体外诱导分化过程中的第一、二天就开始完成转变是一个有待进一步研究的问题。

## 参 考 文 献

许以盛等　1984　一个小鼠未分化胚胎癌细胞特异cDNA的分子克隆。遗传学报　11(5):325—331

丛笑倩和姚鑫　1984　环六亚甲基双乙酰胺对小鼠畸胎瘤B 7—2克隆细胞的诱导分化。实验生物学报 17:309—321

姚鑫、丛笑倩、陈振国　1986　B 7—2胚胎癌细胞诱导分化过程中表型标志的转变。实验生物学报。待发表

Brulet, P. 1984 Early Differential Tissue Expression of a Transposonlike Family During Mouse Embryogenesis. in "China-France Symposium on Cell Differentiation", p21

Meinkoth, J. and wahl, G., 1984 Hybridization of Nuclerc Acids Immobilized on Solid Supports Anal. *Biochem*, 138, 267—284

Xu, Y. S. and Brulet, P., 1983 Cytoplasmic Distribution of a Mouse Embryonal Carcinoma Cell Specific RNA, $MS_3$ RNA. *Zool. Res.* 4(3):295—300

Xu, Y. S. and Brulet, P., 1984 Possible Mechanisms Underlying Expression of $MS_3$ RNA in Mouse Embiyonal Carcinoma Cells. *Zool. Res.* 5(2):139—144

# REPRESSION OF $MS_3$ GENE EXPRESSION DURING HMBA INDUCED DIFFERENTIATION OF AN EMBRYONAL CARCINOMA CELL LINE, B 7—2 IN VITRO

He Quanpin Lin Sijun Xu Yisheng* Yao Zhen

(*Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica*)

We have cloned a cDNA sequence comprising about 300 nucleotides. This cDNA sequence can detect a RNA species with a size of about 6 kb in the total cellular RNAs and the total poly ($A^+$) RNAs of some mouse embryonal carcinoma (EC) cell lines such as F9, PCC3, PSA1, but not in several differentiated derivatives of EC cells examined so far, i. e., TDM1 (trophoblastoma cell), PYS-2 (parietal york saclike cell), 3/A/1-D3 (embryonic fibroblast-like cell) and C17-S1-T384 (myoblast-like cell). Therefore we designate this cDNA sequence as multipotent cell specific sequence ($MS_3$ sequence).

The amount of $MS_3$ RNA in B 7—2 cells before and after induction with HMBA was estimated by the technique of dot blot hybridization. Mouse 3T3 cells were employed as a negative control. Induction with HMBA for 5 days brought about 80% reduction of the amount of $MS_3$ RNA in B 7—2 cells. Since the induction effeciency was about 90%, it is evident that the expression of $MS_3$ gene was repressed in the induced differentiated derivatives of B 7—2 cells.

**Key words** Embryonal carcinoma (EC) Hexamethylenebisacetamide (HMBA) Induced differentiation Multipotent EC cell specific sequence ($MS_3$ sequence) Dot blot hybridization

* *Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica*